

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06098

研究課題名（和文）全長の転写調節因子LTTR-DNA複合体の結晶構造解析と転写活性化機構の解明

研究課題名（英文）Crystal structure analysis of LTTR-DNA complex

研究代表者

千田 美紀（Senda, Miki）

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任助教

研究者番号：10707467

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細菌の転写調節因子の1つであるLysRタイプ転写因子は、病原性関連因子産生や芳香族化合物分解に関する重要な遺伝子群の発現制御を担っている。我々は芳香族化合物分解菌の転写調節因子であるCbnRを対象として研究を行い、全長CbnR-プロモーターとDNAとの複合体の結晶構造を3.6オングストローム分解能で決定した。この成果は、LysRタイプ転写因子の中でプロモーターDNAとの結合様式を構造学的に示した世界で初めての例である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LysRタイプ転写因子(LTTR)に関する研究は世界中で行われているが、LTTR-DNA複合体の再構成や結晶化が極めて難しいため、LTTRとプロモーターDNAとの構造情報に基づき結合様式を示した例はなかった。LTTRはアミノ酸生合成・芳香族化合物分解・病原性関連因子産生・酸化ストレスへの応答など多くの転写調節に関与しているため、構造情報を示すことができればLTTRがプロモーターDNAを認識する仕組みについてのジェネラルな知見を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the molecular mechanism of transcriptional activation of LysR-type transcription factors (LTTRs), we studied the transcriptional regulator CbnR of 3-chlorobenzoate-degrading bacteria. The crystal structure of the complex consisting of a full-length CbnR tetramer and 55 base pairs of promoter DNA was determined at 3.6 angstrom resolution. This is the first crystal structure of a full-length LTTR in complex with its cognate promoter DNA.

研究分野：構造生物学

キーワード：転写調節因子 X線結晶構造解析 タンパク質-DNA複合体

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の代謝経路の機能調節は多くの場合オペロン単位で行われ、転写調節因子によって代謝経路の一連の酵素の発現が制御されることが知られている。細菌の転写調節因子は構造上の特徴からいくつかのグループに分類され、最大のグループの一つである LysR タイプ転写因子 (LTTR) は、芳香族化合物分解・アミノ酸合成・病原性関連因子産生・酸化ストレスへの応答など、様々な重要遺伝子群の発現制御を担っている。LTTR は N 末端側の DNA 結合ドメインと C 末端側の誘導物質結合ドメインから構成され、一般に四量体として存在し、およそ 60 塩基対を覆うようにして DNA に結合する。ほかの転写調節因子と比較して広い範囲をカバーするために認識配列の多様性を生み出しやすく、それゆえに、多くのファミリーが、様々な遺伝子群の発現制御を担うようになったと考えられている。しかし、全長 LTTR-DNA 複合体は精製や再構成が極めて困難であるために全長 LTTR と DNA との複合体の立体構造が決定された例はなく、LTTR による転写制御の分子機構の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

申請者が所属するグループでは、細菌による芳香族塩素化合物分解に必須なクロロカテコール分解酵素遺伝子群の転写調節因子である CbnR を研究対象として LTTR の研究を進めてきており、全長の LTTR としては世界で初めて結晶構造を決定した (Muraoka *et al.*, 2003)。この結晶構造から LTTR が特徴的な四量体を形成すること、4 つの DNA 結合部位 (DBD) が V 字型に配置することが示され、その V 字型構造により DNA を大きく折り曲げるようであることが示唆された。他のグループが行なった生化学的解析などとあわせて、「LTTR が DNA に結合→DNA を V 字型に曲げる→誘導物質依存に LTTR の高次構造が変化→それに伴い LTTR-DNA 間の結合様式が変化→転写活性化」という分子機構モデルが提唱された (図 1)。しかし、全長 LTTR と DNA の共結晶構造解析の成功例がないために、誘導物質の結合による構造変化が DNA 結合の変化に伝わる様子を、立体構造に基づいて考察することはできなかった。

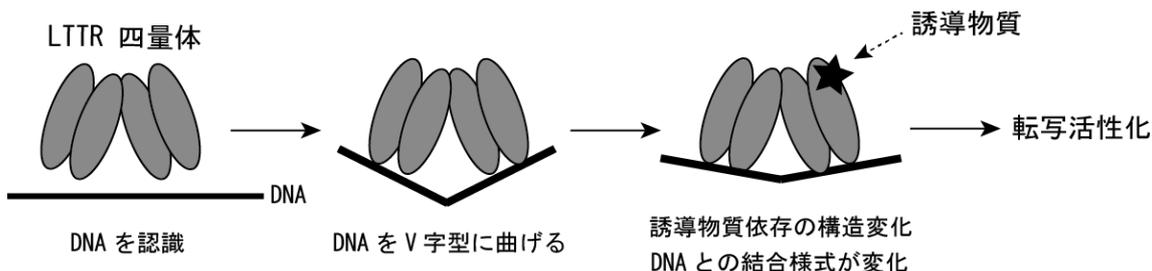


図 1 LTTR による転写制御の分子機構モデル

本研究は、LTTR の一員である CbnR をモデルとして、LTTR による転写活性化の分子機構を世界に先駆けて解明することを目的とした。LTTR は非常に多くの転写調節因子が属するグループであるため、その DNA 結合様式や誘導物質の結合によって引き起こされる制御ドメインの構造変化を原子レベルで明らかにすることができれば、LTTR が誘導物質を特異的に識別して発現制御を行う仕組みについてのジェネラルな知見を得ることができる。

## 3. 研究の方法

研究開始当時、既に全長 CbnR-DNA 複合体の再構成と結晶化には成功しており、6.9 Å と低分解能ながらも結晶構造が得られていた。そのため、結晶化条件の最適化及び結晶を液体窒素で冷却する際のクライオ条件の検討により結晶の質を改善しつつ、高分解能のデータを得ることを試みた。X 線回折データの収集は、申請者が所属する高エネルギー加速器研究機構のビームライン Photon Factory BL-1A を用いて行った。このビームラインでは、13 ミクロン x 13 ミクロンの細いビームを用いて低エネルギー(波長 1.9 Å や 2.7 Å)での回折データ収集が行えるため、細長い CbnR-DNA 複合体結晶からの native SAD データ収集に適している。位相決定は基本的には分子置換法で行ったが、タンパク質分子のメチオニンやシステイン由来の硫黄原子や DNA 由来のリン原子の異常分散効果を利用した native SAD データと組み合わせた MR-native SAD 法による電子密度マップもモデル構築のために利用した。モデル構築や結晶学的精密化は、一般に X 線結晶構造解析に用いられているプログラム ccp4, phenix, coot を用いて行った。

## 4. 研究成果

全長 CbnR-DNA 複合体の結晶化条件の最適化により、0.3-0.4mm 程度の大きさの柱状結晶が再現性良く得られるようになった (図 2-a) 最終的な結晶化条件は 20%(w/v) PEG3350, 4%(v/v) Tacsimate pH 8.0, 0.5%(w/v) n-octyl-pyranoside とした。得られた結晶を用いてクライオ条件の最適

化を行った結果、トレハロースまたはエリスリトールを用いた場合に分解能が 3.6 Å 分解能まで改善できた (図 2-b)。

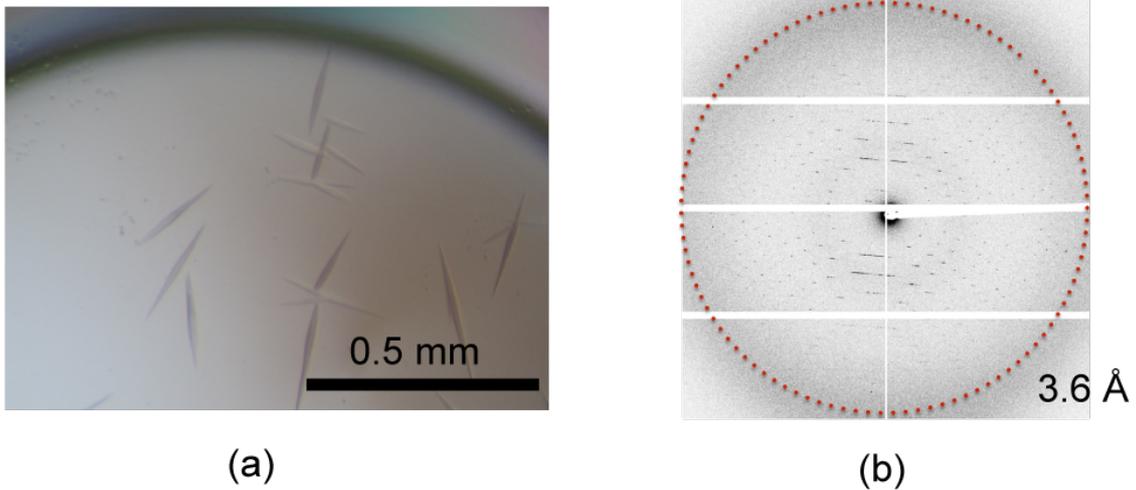


図 2 全長 CbnR-DNA 複合体結晶(a)とクライオ条件最適化後の回折パターン(b)

エリスリトールを含むクライオプロテクタント溶液 (30%(w/v) エリスリトール, 27.5%(w/v) PEG3350, 3%(v/v) Tacsimate pH 8.0, 0.5%(w/v) n-octyl-pyranoside) を用いて結晶を凍結し、BL-1A で波長を 1.9 Å として回折データを収集した結果、4 Å 分解能以上のデータを 5 セット収集することができた。CbnR 四量体 (Muraoka *et al.*, 2003) と CbnR の DNA 結合ドメインと DNA(RBS) との複合体の結晶構造(Koentjoro *et al.*, 2018)を用いた分子置換法により部分構造を決定し、部分構造に含まれる硫黄原子から MR-native SAD 法による電子密度マップを計算した。X 線による損傷を軽減したデータを収集するためにヘリカルモードによるデータ収集を行っていたが、データ処理に用いる結晶の範囲に依存して DNA の電子密度の明瞭さが異なることがわかってきたため、様々な範囲で処理したデータを用いて DNA の電子密度の見え方を比較し、DNA の電子密度が最も明瞭に見えるデータを構造精密化のために用いた。最終的に選択したデータを用いて 3.6 Å 分解能で計算した Composite omit map と構築したモデルを図 3 に示す。

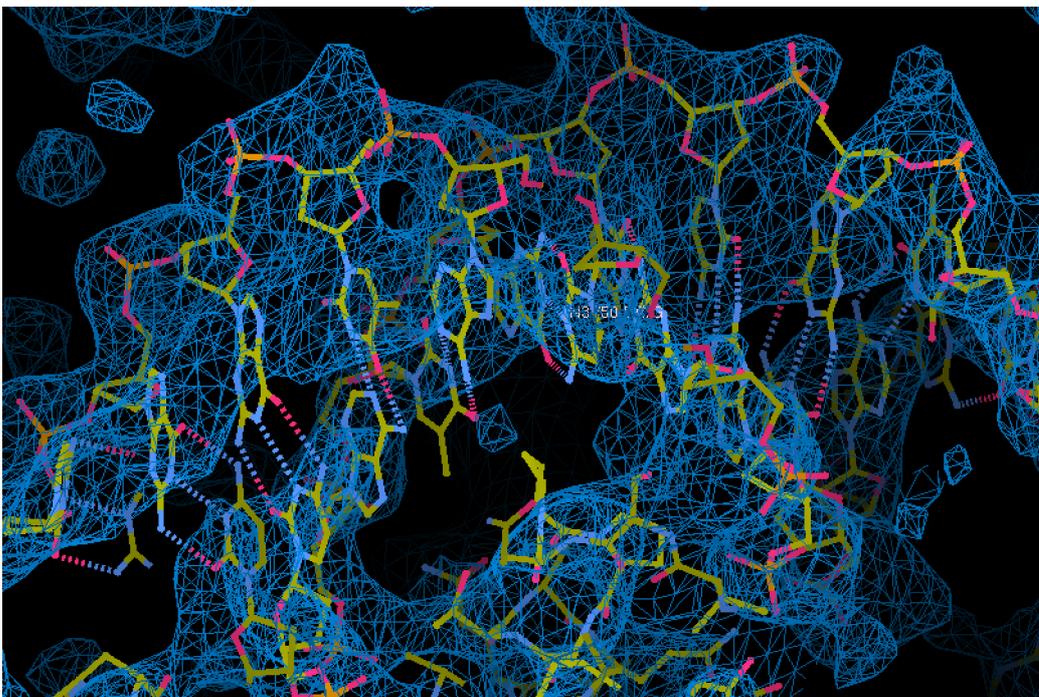


図 3 Composite omit map (1 sigma)

最終的には 3.6 Å 分解能で freeR/R=0.285/0.234 まで構造精密化を行い、Protein Data Bank に PDB ID 7D98 として登録した。全長 CbnR-DNA 複合体の結晶構造を図 4 に示す。

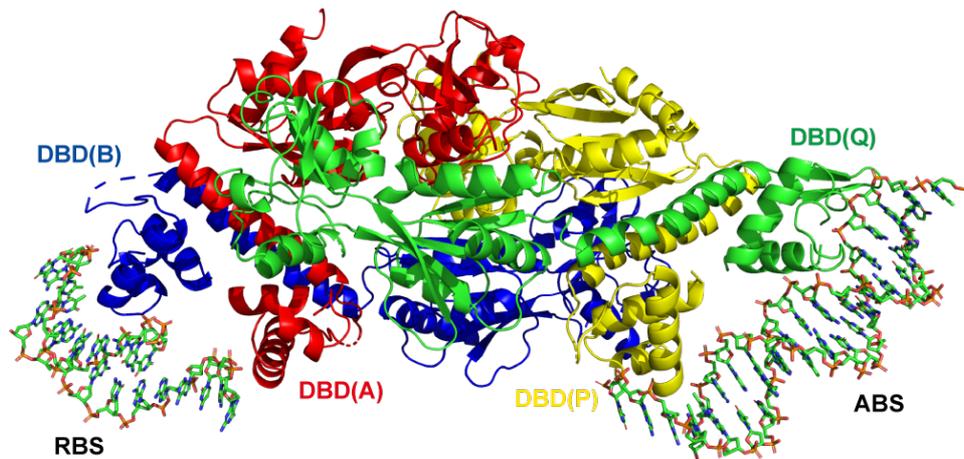


図 4 全長 CbnR-DNA 複合体の結晶構造

<引用文献>

1. Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. & Senda, T. (2003) Crystal Structure of a Full-length LysR-type Transcriptional Regulator, CbnR: Unusual Combination of Two Subunit Forms and Molecular Bases for Causing and Changing DNA Bend. *J Mol Biol*, 328, 555–566.
2. Koentjoro, M. P., Adachi, N., Senda, M., Ogawa, N. & Senda, T. (2018). Crystal structure of the DNA-binding domain of LysR-type transcription regulator CbnR in complex with DNA fragment of the recognition binding site in the promoter region. *FEBS Journal*, 285, 977-989.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Giannopoulou Evdokia Anastasia, Senda Miki, Koentjoro Maharani Pertiwi, Adachi Naruhiko, Ogawa Naoto, Senda Toshiya	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystal structure of the full length LysR type transcription regulator CbnR in complex with promoter DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MATSUGAKI Naohiro, YAMADA Yusuke, HIKITA Masahide, HIRAKI Masahiko, SENDA Miki, SENDA Toshiya	4. 巻 62
2. 論文標題 Macromolecular Crystallography Using Long Wavelength X-ray	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 56～61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.62.56	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SENDA Miki, ADACHI Naruhiko, SENDA Toshiya, KOENTJORO Maharani Pertiwi, OGAWA Naoto	4. 巻 60
2. 論文標題 Crystal Structure of the DNA-binding Domain of the LysR-type Transcriptional Regulator CbnR in Complex with a DNA Fragment of the Recognition-binding Site	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 135～141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.60.135	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 タンパク質結晶化の総合戦略
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Senda, Toshiya Senda
2. 発表標題 Comprehensive strategy for efficient generation of well-diffracted crystals
3. 学会等名 ACA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田美紀
2. 発表標題 良質なタンパク質結晶を得るための戦略
3. 学会等名 平成30年度第2回構造生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Senda, Toshiya Senda
2. 発表標題 Crystallization strategy when no crystals are obtained in the initial screening,
3. 学会等名 Structural Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 良質なタンパク質結晶と回折データを効率的に得るための戦略
3. 学会等名 結晶学会平成30年度年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Senda, Toshiya Senda
2. 発表標題 Crystallization strategy when no well-diffracted crystals are obtained in the crystallization screening.
3. 学会等名 American Crystallographic Association (ACA) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------